

乙型肝炎治疗的新靶点与新方法

曲建慧, 张玲霞, 成 军, 辛绍杰

曲建慧, 张玲霞, 成军, 辛绍杰, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

抗病毒治疗一直是乙型病毒性肝炎治疗过程中的重要环节,但目前所用的抗病毒治疗措施均有其局限性.寻找新的、有效的抗病毒治疗措施应从病毒的生命周期、机体的免疫反应出发,以达到抑制病毒复制以至清除病毒的目的.基因治疗方法也正处于研究阶段.本文就目前乙型病毒性肝炎的抗病毒治疗及其进展方面作一阐述.

曲建慧, 张玲霞, 成军, 辛绍杰. 乙型肝炎治疗的新靶点与新方法. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1663-1666

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1663.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)在慢性乙型肝炎(CHB)患者体内的持续复制,可以导致不同程度的肝内炎症,而且与肝硬化和肝细胞癌(HCC)的发生密切相关. HBsAg疫苗的广泛应用,在一定程度上能够安全有效地预防 HBV 感染,降低了感染的发生率^[1],而对于慢性 HBV 感染者,应用抗病毒化学药物治疗,在抑制病毒活跃复制、阻止威胁生命的肝脏疾病的发展方面也展现了良好的前景^[2]. 有效地进行抗病毒治疗,可以诱导疾病缓解,阻止肝硬化进程,防止出现肝衰竭和/或肝细胞癌的严重后果. HBV 感染的肝细胞与宿主免疫反应之间复杂的相互作用极大地影响着疾病的临床过程,因而影响了临床处理策略. 目前所用的抗病毒治疗主要是通过干预病毒复制过程或者针对宿主抗病毒的不同环节,达到抵抗病毒、保护机体的作用,但任何治疗方法都有其应用的局限性,使 HBV 感染始终是困扰人们的难题,寻找新的有效治疗药物也一直是人们不懈追求的目标.

目前只有干扰素 α (IFN α)、拉米夫定、阿德福韦(ADV)是获批准的治疗 CHB 的药物. 在 HBeAg 阳性和 HBeAg 阴性的 CHB 患者,这些药物治疗具有相似的短期作用与有限的长期效应,因此,需要寻找新的治疗措施,以克服他们所存在的局限性. 最近几种新的抗

HBV 复合物正在评估之中,其中包括恩替卡韦, emt-ricitabine(LMV 的 5- 氟衍生物), clevudine(L-FMAU)以及其他的 L- 核苷例如 L- 脱氧胸腺嘧啶(L-dT).

另外,某些免疫调节剂,例如白介素 -2(IL-2)、干扰素 γ (IFN γ)、胸腺素 α 、疫苗等的治疗效果尚有争议^[3-4]; DNA 疫苗治疗方法,虽然理论上似乎很有吸引力,但在临床应用方面却没有更大的进展^[4-5]; 两种聚乙二醇化的干扰素, PEG-IFN α -2b、PEG-IFN α -2a, 是治疗慢性 HCV 的较有前途的药物,最近已经应用于慢性乙型肝炎的治疗. 将来以上这些方法的发展会为临床工作者提供更多的治疗选择.

1 病毒的生命周期

要确认潜在的抗病毒靶点,理解 HBV 生命周期是很关键的. 成熟的 HBV 病毒颗粒由整合了病毒表面蛋白的脂质双层包绕核粒核心组成. 核粒内部是结构紧凑、呈松弛环状结构的 3.2 kb 的部分双链 DNA 基因组,具有重叠的开放读码框架(ORF),分别编码 HBsAg(L, M, S), HBcAg, HBeAg, 聚合酶和 X 蛋白.

HBV 的复制始于病毒与肝细胞表面的受体黏附,介导病毒进入细胞,脱去核衣壳,转移至细胞核,松弛环状基因组通过宿主细胞机制转变成 cccDNA,这个复制中间体是产生各种 HBV RNAs 的转录模板,包括前基因组 RNA(pgRNA),为病毒复制所必须,也是有效治疗、控制 CHB 的主要障碍. 3.5 kb 的 pgRNA 的转录发挥三方面的作用: (1)其翻译可以产生核心蛋白与聚合酶蛋白; (2)参与核粒包装反应,其特异性由一个特殊的位于 pgRNA 的 5' - 和 3' - 末端的称为 ϵ 的茎 - 环 - 茎结构所决定,宿主蛋白例如 Hsp90 可以稳定这种 pol- ϵ 的相互作用^[6]. 顺式翻译的核心蛋白在 pgRNA-pol 复合物周围形成二聚体,自我排列形成病毒核粒; (3)一旦装配成核粒,pgRNA 即发挥逆转录模板的作用:聚合酶蛋白结合至 5' - ϵ - 结构,作为自身引物起始并合成负链 DNA 的前 3 个核苷酸,新生 DNA 再转位到 pgRNA 的 3' - 末端,结合至 12 nt 的 DR1 互补序列,负链 DNA 在此继续合成,聚合酶蛋白的 RNA 酶 H 活性使模板 pgRNA 降解. 这个 RNA 寡聚体转移至 12 nt 重复的 DR2,开始合成正链 DNA. 正链 DNA 从负链 DNA 的 5' - 末端延伸,出现了第 3 条链转换. 这由在负链 DNA 模板的一个短的富余片段所促进,这个片段与正链 DNA 5' - 末端的富余片段退火,因而使基因组环化^[7]. 聚合酶蛋白对正链 DNA 合成的成熟前终止引起特征性的部分双链

基因组. 含有部分 dsDNA 的 HBV 核粒或者循环回核, 增加 cccDNA 的供应, 或者在内质网和高尔基体进一步组装. 成熟的病毒粒通过组成型分泌途径从细胞中运出.

2 宿主对 CHB 感染的反应

急、慢性 HBV 感染导致的肝脏疾病主要是由免疫反应介导, 理解对 HBV 免疫反应的复杂性与多样性, 具有免疫治疗意义. HBV 感染的动物模型例如 HBV- 感染猿、HBV 转基因鼠的应用, 对于研究免疫反应与肝脏疾病、病毒的控制与清除方面具有重要意义^[8-9], 但是, 动物模型的应用尚存在一定的局限性, 尤其在 HBV- 转基因鼠模型中, 缺乏 cccDNA 的产生与加工等关键的 HBV 复制事件.

HBV 感染的过程受到免疫反应强烈程度的影响. 感染早期、固有的和调节性免疫反应对于 HBV 的清除是很关键的. 抗原提呈细胞, 尤其是树突状细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞, 在刺激 CD4⁺ 辅助性 T 细胞、CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞以控制肝内 HBV 复制中起着重要的作用. 根据所分泌细胞因子的不同, 这些细胞可分为 Th1 与 Th2 细胞, 诱导原发性细胞介导的免疫反应. Th1 细胞主要产生 IL-2, Th2 主要产生白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)和白介素-10(IL-10), 触发体液免疫反应以产生抗体. 当 Th1、细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)细胞都活化, 并对病毒包膜、聚合酶、核心蛋白产生多特异性抗体, 可达到对 HBV 的清除^[10]. 主要活化 Th2 细胞以产生抗体的免疫反应可能会导致 HBV 感染的持续, 因此, T 细胞亚群的不一致性可能是导致新生儿与成人急性感染过程中, HBV 持续存在的原因之一.

一般认为, HBV 清除是通过 CTL 活化的穿孔素或 Fas- 依赖性途径的细胞因子介导的对 HBV 感染细胞的破坏, 而现在有新的观点强调了细胞因子介导的非溶细胞性 HBV 清除^[9]. 在急性 HBV 感染的猿猴与 HBV 转基因鼠的研究中发现, 细胞因子, 主要是肿瘤坏死因子 α (TNF α), IFN γ 和 IFN α/β , 可以不必杀死肝细胞而抑制 HBV 复制; 在转基因鼠模型中诱导这些细胞因子, 能够至少干扰 HBV 生命周期的两条途径: HBV RNA 的转录后降解以及清除含有 pgRNA 的非成熟核粒, 导致 HBV 核心蛋白的翻译后缺失^[10]. IFN α/β 可能活化与 dsRNA- 依赖的蛋白激酶(PKR)和 dsRNA- 依赖的 2', 5'- 寡腺苷酸合成酶有关的两条细胞路径, 对双链 RNA 蛋白激酶(PKR)的诱导可能导致 HBV 蛋白合成的抑制, 而对 2', 5'- 寡腺苷酸合成酶的诱导活化了 RNase L 以降解 HBV RNA. IFN α/β 和 IFN γ 可诱导细胞基因的转录改变^[11]. 但是, 这些细胞因子诱导的作用于 HBV 复制的“分子抗病毒”的意义还不明确.

通过转基因鼠研究, 逐渐阐明了 HBV RNA 转录后降解的基本分子基础^[9]. 研究表明, 在 TNF α 和 IFN 被诱导后的病毒 RNA 降解过程中, 细胞蛋白-La 蛋白,

发挥着一定的作用. 在 HBV 中, 这种蛋白特异地结合一个在病毒 RNA 内的位于转录后调节元件的茎-环结构 5'-末端, 可能介导 HBV RNA 的核移出. 最近研究表明, La 蛋白上的特异性 HBV RNA 结合点可能是潜在的抗病毒靶点. 目前, 尚不了解在 CHB 患者中控制 HBV 复制的非溶细胞过程的免疫反应. 从临床应用角度, 面对的挑战应该是建立免疫治疗方案, 克服少数炎症细胞浸润或肝细胞坏死的 T- 细胞低反应性^[12-13], 开拓非溶细胞的 HBV 从肝细胞中清除过程.

3 新治疗靶点

HBV 生命周期表明, 除了逆转录过程, 多数病毒过程依赖于宿主细胞机制, 其中最重要的是 cccDNA 的产生与持续存在. 传统的病毒 DNA 合成抑制物例如核苷类似物能够阻止或降低 cccDNA 新分子的产生, 但是, 成功清除已存在嗜肝 cccDNA 只能通过非细胞溶解的 Th1 免疫反应或通过免疫介导的细胞杀伤作用^[14-15]. 另外, 核苷类似物治疗 CHB 还能够(部分)恢复(特异性)免疫反应, 这一点很重要, 这对于介导宿主对感染的持久控制是必要的^[16]. 总之, 成功治疗 CHB 的重点是集中到抗病毒与免疫调节方法治疗两方面内容上.

3.1 小分子抑制剂 核苷/核苷酸类似物是聚合酶抑制剂, 通过细胞激酶代谢成三磷酸形式, 能选择性或竞争性抑制病毒聚合酶的催化作用; 类似物的整合(如 LMV 和 ADV)也可以导致新生病毒基因组的链终止; 另外, 由于在 HBV 负链 DNA 的引物序列的核苷酸是 5'-GAA-3', 因而嘌呤核苷类似物能抑制聚合酶的引物活性^[6-7, 17]. 许多核苷/核苷酸类似物在 CHB 中的应用已得到检验, 例如拉米夫定、阿德夫韦、恩替卡韦、LY582563、MIV-210 等.

最近发现另外几种复合物具有 HBV 抑制的机制, 但与病毒聚合酶不相关. 第1种是苯丙酰胺衍生物: AT-61 和 AT-130. King et al^[18]表明 AT-61 并不影响总 HBV RNA 的产生或 HBV DNA 聚合酶的活性, 但确实能明显降低核壳化的 RNA. 重要的是, AT-61 和 AT-130 对于野生型和多种不同 LMV- 抗性株具有同样的抗病毒活性^[19]. Feid et al^[20]应用能够顺式包装 HBV RNA 的重组杆状病毒系统和一个能够反式包装 HBV 核心蛋白的表达载体系统观察了 AT-130 的作用机制: 体外研究表明, AT-130 明显抑制了核壳化 HBV RNA 的产生, 但对于总 HBV RNA 没有作用, 也并不影响核心蛋白或核粒的产生, 表明其本身能够干扰核壳化过程, 其机制可能是通过空间抑制或者与宿主细胞伴随蛋白例如 Hsp90 相互作用. 苯丙酰胺不是水溶性的并具有极低的生物利用度, 成功地发展成抗病毒药还需要克服其潜在的毒性和药物化学事件. 但是, 这些发现证明了野生型与药物抗性 HBV 能够非依赖于病毒聚合酶而被选择性地复制水平明显抑制.

体内、外实验还表明, 另一组复合物, 异芳基二

氢嘧啶(HAP), 也是潜在的 HBV 复制的非核苷抑制剂^[21], HAP 复合物由 Bayer 公司发现, 包括的候选分子有 Bay41-4109 及其同种物 Bay38-7690、Bay39-5493. 受 Bay41-4109 作用的 HBV 感染细胞, 通过抑制病毒核粒的形成导致核心蛋白的降解增加, 在 HBV 转基因鼠中也发现这些 HAP 复合物具有抗 HBV 的作用^[21]. 这种新的作用机制和高度特异性的抗病毒作用表明, HAP 复合物可能会进入将来的临床研究. 第 3 种复合物, LY582563, 是一种 2-氨基-6-芳硫-9-磷甲氧乙基嘌呤双酯, 一种新的核苷类似物, 磷甲氧乙基嘌呤的衍生物, 其结构类似于 ADV. 这种复合物具有极好的抗 HBV 活性和较低的毒性^[22], 对于具有 LMV-抗性的 HBV 也是有效的, 其作用机制及早期临床正在研究之中.

3.2 基因治疗方法 基因治疗是将新的基因材料导入靶细胞中, 以产生对宿主细胞的治疗作用. 抗病毒基因治疗策略如核酶、反义寡核苷酸、干扰肽或蛋白、治疗性 DNA 疫苗已经被研究用于 CHB 的分子治疗. 而且, 治疗或阻止 CHB 相关肝硬化或肝癌的分子策略也正在研究之中^[5, 23]. 一种新的分子治疗方法是 siRNA. RNA 干扰是一种序列特异性的基因沉默的细胞过程, 小双股 RNA 靶向一个同源序列, 通过细胞核酶使之裂解^[24]. 大约 22 nt 的 siRNA 导入哺乳动物细胞, 能够导致细胞 mRNAs 特异性地沉默, 而没有由长双股 RNA 激活所诱导的非特异性的干扰素反应, 这种方法已经在细胞培养中成功地用于 HBV 和 HCV 复制子 RNA^[25]. siRNA 分子可以显著降低病毒特异性蛋白表达和 RNA 合成, 并且这些抗病毒作用非依赖于 IFN. siRNA 以及传统的基因治疗, 虽然是很有前途的治疗方法, 但在基因传递、稳定性、毒性、抗性以及安全性等方面仍有很多问题有待解决.

3.3 免疫调节治疗 免疫调节治疗的目的是刺激宿主 HBV-感染细胞的免疫反应而清除病毒感染. IFN α 和胸腺肽 α ^[4-5] 已经用于临床, 本文强调其他对治疗 CHB 有用的免疫调节药物. 白介素-12(IL-12)与白介素-18(IL-18)由活化的巨噬细胞和树突状细胞分泌. IL-12 通过促进 Th1 细胞反应在调节免疫系统中发挥重要作用^[26]. 在 IL-12 存在的情况下, IL-18 能够作用于 Th1 细胞、NK 细胞和树突状细胞, 诱导 IFN γ 的产生^[26-27]. 在 HBV 转基因鼠的研究中表明, IL-12 可能通过局部诱导淋巴细胞分泌 IFN γ , IFN α/β 和 TNF α 而发挥间接抗病毒作用, 下调了肝内、外病毒的复制. 在应用 IFN α 治疗患者中的观察表明, 在 IFN- α 应答者中, IL-12 以及 IL-2, IFN- γ 的水平明显高于无应答者^[28]. 最近, IL-12 在 CHB 中的 I/II 期研究表明, 剂量 0.25 与 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 治疗 12 wk, 血清 HBV DNA 显著降低, 但是其总的抗病毒作用低于 IFN α 或 LMV. 研究表明, 短期的 IL-12 治疗是安全的, 副反应与 IFN α 相似. 在转基因鼠的研究中, Kimura et al^[27] 表明 IL-18 通过 IFN γ 、IFN α/β

β 介导的非细胞病理过程, 抑制了肝内 HBV 复制, 这些结果也说明 IL-18 能协同 IL-12 抑制 HBV 复制, 表明联合给予 IL-18 和 IL-12 对 CHB 是有治疗作用的.

在病毒感染中, 树突状细胞作为抗原递呈细胞, 对于刺激调节性免疫方面发挥重要作用. 他们刺激 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞, 产生影响 Th1/Th2 免疫平衡的细胞因子^[29]. 除了抗原递呈功能, 激活的成熟树突状细胞还能分泌许多 Th1 和 Th2 型细胞因子, 如 IFN α/β , TNF α , IL-1, IL-8 和 IL-12 等. HBV 感染时, 树突状细胞在影响 Th1、Th2 反应中的有关资料还很有限, 树突状细胞功能的损伤可能导致 HBV 慢性化^[28-30]. 有趣的是, 树突状细胞虽然是免疫反应的刺激子, 但另一方面他又能通过 T-细胞无反应性或 T 细胞排除诱导免疫耐受性, 其介导的耐受性尚不完全了解, 而且这些细胞是否能够导致新生儿耐受而引起 HBV 感染持续尚需进一步探讨. 近年来, 树突状细胞在处理免疫反应的效应方面已有临床研究: 体外培养树突状细胞并用抗原(如重组肿瘤与病毒抗原)刺激, 然后自体转输, 作为几种临床实验的免疫治疗^[31], 但树突状细胞在 CHB 免疫治疗中的作用尚不成熟, 应用合适的 HBV 蛋白激活树突状细胞、克服免疫耐受、诱导多种对 HBV 的特异性免疫需要深入研究^[32-33].

目前, 长期抗病毒治疗所致 HBV 耐药株的出现以及治疗后较低的持续/长期应答率, 是 HBV 治疗中两个棘手问题, 也给我们提出了新的挑战. HBV 发病机制的深入研究以及新免疫治疗方法的发现, 可能会提供一些有用的方法. 另外, 在 CHB 治疗中, 目前还不清楚是单独应用核苷/核苷酸类似物治疗, 还是应该在核苷/核苷酸类似物基础上加用免疫调节剂, 这需要进行深入的临床研究. 在将来的应用中, 也有可能进行三联药物治疗, 例如两种核苷/核苷酸类似物联合应用 PEG-IFN 等. 同时, 新的抗-HBV 药物的产生, 包括非核苷类似物, 例如病毒包装抑制剂、免疫治疗(如树突状细胞疫苗), 将来对 CHB 治疗可能会获得良效.

4 参考文献

- 1 Kane M. Global status of hepatitis B immunization. *Lancet* 1996;348:696
- 2 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58
- 3 Delaney WE 4th, Locarnini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir Chem Chemother* 2001;12:1-35
- 4 Delaney W 4th, Bartholomeusz A, Locarnini SA. Evolving therapies for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:169-187
- 5 Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:761-785
- 6 Hu J, Toft D, Seeger C. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J* 1997;16: 59-68
- 7 Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication-an update. *J Viral Hepatitis* 1996;3:217-226

- 8 Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-829
- 9 Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91
- 10 Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165-4173
- 11 Wieland SF, Vega RG, Muller R, Evans CF, Hilbush B, Guidotti LG, Sutcliffe JG, Schultz PG, Chisari FV. Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes. *J Virol* 2003;77:1227-1236
- 12 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Grner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
- 13 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 14 Guo JT, Zhou H, Liu C, Aldrich C, Saputelli J, Whitaker T, Barrasa MI, Mason WS, Seeger C. Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J Virol* 2000;74:1495-1505
- 15 Kajino K, Jilbert AR, Saputelli J, Aldrich CE, Cullen J, Mason WS. Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J Virol* 1994;68:5792-5803
- 16 Boni C, Bertoletti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, Scognamiglio P, Boehme R, Panbianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998;102:968-975
- 17 Lanford RE, Notvall L, Beames B. Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells. *J Virol* 1995;69:4431-4439
- 18 King RW, Ladner SK, Miller TJ, Zaifert K, Perni RB, Conway SC, Otto MJ. Inhibition of human hepatitis B virus replication by AT-61, a phenylpropenamide derivative, alone and in combination with (-) beta-L-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3179-3186
- 19 Delaney WE 4th, Edwards R, Colledge D, Shaw T, Furman P, Painter G, Locarnini S. Phenylpropenamide derivatives AT-61 and AT-130 inhibit replication of wild-type and lamivudine-resistant strains of hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3057-3060
- 20 Feid J, College D, Sozzi T. The phenylpropenamide derivative AT-130 inhibits HBV replication at viral encapsidation and packaging. *Hepatology* 2002;36:300A
- 21 Deres K, Schroder CH, Paessens A, Goldmann S, Hacker HJ, Weber O, Kramer T, Niewohner U, Pleiss U, Stoltefuss J, Graef E, Koletzki D, Masantschek RN, Reimann A, Jaeger R, Gross R, Beckermann B, Schlemmer KH, Haebich D, Rubsamens-Waigmann H. Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science* 2003;299:893-896
- 22 Kamiya N, Kubota A, Iwase Y, Sekiya K, Ubasawa M, Yuasa S. Antiviral activities of MCC-478, a novel and specific inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2872-2877
- 23 Branch AD. A hitchhiker's guide to antisense and nonantisense biochemical pathways. *Hepatology* 1996;24:1517-1529
- 24 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
- 25 Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:235-240
- 26 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001;19:423-474
- 27 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002;76:10702-10707
- 28 Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1997;99:3025-3033
- 29 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
- 30 Beckebaum S, Cicinnati VR, Dworacki G, Muller-Berghaus J, Stolz D, Harnaha J, Whiteside TL, Thomson AW, Lu L, Fung JJ, Bonham CA. Reduction in the circulating pDC1/pDC2 ratio and impaired function of ex vivo-generated DC1 in chronic hepatitis B infection. *Clin Immunol* 2002;104:138-150
- 31 Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001;7:761-765
- 32 Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1998;161:4520-4529
- 33 You Z, Huang XF, Hester J, Rollins L, Rooney C, Chen SY. Induction of vigorous helper and cytotoxic T cell as well as B cell responses by dendritic cells expressing a modified antigen targeting receptor-mediated internalization pathway. *J Immunol* 2000;165:4581-4591

World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求。WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用。WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切。北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订。WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美。